Münster i/W. 1934. 12/75 Med Diss.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster/Westf.
Direktor: Prof. Dr. med. et phil. H. Freund.

Der Einfluß von Leberextrakten auf den Calcium- u. Phosphatgehalt des Serums.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde einer
Hohen Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität
zu
Münster/Westf.

vorgelegt von
Heinrich Nordbrock
aus Kaunitz/Westf.

Buch- und Kunstdruckerei Wilh. Postberg, Bottrop i.W.
1933

Dekan: Prof. Dr. Esch
Referent: Prof. Dr. K. Zipf.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Gedruck mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Westtälischen Wilhelms-Universität zu Münster i. W.

A. Einleitung.

Nach Einführung von antianämisch wirkenden Leberextrakten in die Therapie hat es sich bald als notwendig und wünschenswert erwiesen, die Handelspräparate auf einen konstanten Wirkungswert einzustellen. Trotz vieler Versuche auf diesem Gebiete [1]), ist es aber bisher nicht gelungen, ein einfaches Testverfahren aufzufinden. Man ist deshalb auf den Versuch an dem perniciosakranken Menschen angewiesen. Dieses Verfahren ist naturgemäß zeitraubend und umständlich und eignet sich in keiner Weise für Serienversuche. Dadurch werden alle Versuche der chemischen Isolierung des antianämischen Prinzips sehr erschwert. Es besteht daher nach wie vor das dringende Bedürfnis nach einem einfachen Laboratorium-Testverfahren.

Nach neuern Feststellungen kommt den Leberextrakten neben der antianämischen Wirksamkeit noch eine entzündungshemmende Wirkung zu. Milbradt [2]) hat nämlich gezeigt, daß die Salvarsandermatitis beim Menschen und die Erscheinungen der Salvarsansensibilisierung am Tier durch Leberextrakt (Hepatrat) gehemmt werden. Zu ähnlichen Ergebnissen führten Untersuchungen aus den wissenschaftlichen Laboratorien der I. G. Farbenindustrie. Nach einem Patentanspruch der genannten Firma [3]) gelingt es bei Tieren künstlich gesetzte Entzündungsreaktionen durch antianaemisch wirkende Leberextrakte zu verhindern. Die entzündungshemmende Wirkung soll mit der antianaemischen parallel gehen und wird deshalb als Testreaktion der Leberextrakte angewandt. Ueber die Brauchbarkeit der Methode ist bisher in der Oeffentlichkeit nichts bekannt geworden.

Der Mechanismus der Entzündungshemmung durch antianaemisch wirkende Leberextrakte ist noch ungeklärt. Es ist aber

---

[1]) Zipf, K.: „Pharmakologische Grundlagen der Lebertherapie" in A. Fraenkel, „Der Weg zur rationellen Therapie", Leipzig, G. Thieme 1933. Zipf K. u. Dringenberg, H.: Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 1933, Bd. 170, S. 465. Kaltenbach, M.: Dissertation, Münster i. Westf. 1933.

[2]) Milbradt, W.: Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 1931, Bd. 160, S. 489.

[3]) Vpf. z. Gewinnung von Organpräparaten, die eine Wirkung gegen die pern. Anämie zeigen. P.A. No.: 138 000, 17. 2. 32.

naheliegend in diesem Zusammenhang an die Mitwirkung des Calciums zu denken. Denn es ist allgemein bekannt, daß letzteres stark entzündungshemmend wirkt[4]). Es wurde deshalb untersucht, ob der Calciumgehalt des Kaninchenserums durch Leberextrakte in gesetzmäßiger Weise beeinflußt wird. Da die Calciumionenkonzentration im Serum weitgehend abhängig ist vom Phosphatgehalt[5]), so wurde auch das Verhalten des letzteren in die Untersuchung mit einbezogen.

B. Methodik.

Die Versuche wurden am Kaninchen ausgeführt. Der Calciumgehalt des Kaninchenserums ist weitgehend unabhängig von der Nahrungsaufnahme[6]). Die Werte schwanken zwischen 10 und 20 mg % mit einem Mittelwert von 16 mg %[7]). Nach Bečka[8]) beträgt der Normalwert des Serumcalciums bei Kaninchen von 1900—2800 g Körpergewicht im Durchschnitt 12 mg %. Längeres Hungern führt zu einem Absinken des Calciumgehaltes[9]).

Unsere Versuchstiere (13) hatten mit Ausnahme von drei Kaninchen ein Gewicht zwischen 2010 und 2880 g und wurden konstant gefüttert. Die Blutentnahme geschah jeweils in nüchternem Zustand aus der Ohrrandvene. Längeres Hungern (über 24 Stunden) wurde vermieden. Die Versuche wurden in zwei Reihen vorgenommen. In einer ersten Versuchsreihe erhielten die Tiere nach Blutentnahme zur Bestimmung des Normalwertes tgl. subkutan Leberextrakt injiziert. Nach 10tägiger Vorbehandlung wurde wiederum der Calciumwert im Serum bestimmt. In einer zweiten Versuchsreihe erhielten die Tiere nur eine einmalige Leberextraktinjektion. Vier Stunden nachher wurde wiederum das Serumcalcium bestimmt. Die letzteren Versuchstiere

---

[4]) Literatur bei Starkenstein, E.: Handb. d. Norm. u. Path. Physiol. Bd. XIII, S. 380/81 (Wright, A. E. Lancet 1896, 153, 807. — Chiari u. Januschke: Wien. klin. Wo. 1910, Nr- 12; Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 65, 120, 1911. — Blum, L.: Presse med. 30, 221, 1922. — Leo: Dtsch. med. Wo. 1911, Nr. 1, 5. — Levy: Dsch. med. Wo. 1914, Nr. 19, 948. — Starkenstein, E.: Arch. exp. Path. u. Pharm. 1914, Bd. 77, S. 45.

[5]) Literatur bei Heubner, W.: Handb. d. Norm. u. path. Physiol. Bd. XVI/2, S. 1452 (György: Klin. Wo. 1922, 1399 — Jb. Kinderheilk. 102, 145, 1923. — Kugelmann u. Shohl: J. of biol. Chem. 58, 649, 1924).

[6]) Clark: J. of biol. Chem. 43, 89, 1920, zit. n. Heubner, W.: Handb. d. Norm. u. Path. Physiol. Bd. XVI/2, S. 1446.

[7]) Heubner, W.: Handb. d. Norm. u. Path. Physiol. Bd. XVI/2, S. 1446.

[8]) Bečka, Jan: Arch. exp. Path. u. Pharm. 1933, Bd. 170, S. 382.

[9]) Goto: J. of biol. Chem. 1, 321, 1922, zit. n. Heubner: ebenda.

wurden 12 Stunden vorher und während des eigentlichen Versuches, also im Ganzen 16 Stunden, nüchtern gehalten. Die Tiere der ersten Versuchsreihe erhielten jeweils 24 Stunden vor der Blutentnahme kein Futter. In der 10tägigen Zwischenperiode wurden sie normal gefüttert.

Zur Calcium- und Phosphatbestimmung wurde das aus der Ohrrandvene entnommene Blut nach Gerinnung zentrifugiert und das Serum vom Fibringerinnsel abgetrennt. Ein Teil des Serums wurde direkt zur Calciumbestimmung nach der Methode von Kramer und Tisdall[10]) verwendet. Das Prinzip der Methode besteht darin, daß das Calcium im Serum mit Ammoniumoxalat gefällt, der Calcium-Oxalatniederschlag mit Schwefelsäure gelöst und in der Wärme mit Kaliumpermanganat titriert wird. Aus dem titrierten Wert wurde in bekannter Weise der Calciumgehalt pro 100 ccm Serum berechnet.

Ein anderer Teil des Serums wurde mit Trichloressigsäure enteiweißt und das Filtrat zur Bestimmung des anorganischen Phosphors nach Fiske und Subbarow[11]) verwendet. Die Brauchbarkeit dieser Methode ist in den letzten Jahren von Haarmann und Mitarbeitern im hiesigen Institut vielfach bestätigt worden.

C. Experimenteller Teil.

1. Normalwerte für den Calcium- und Phosphatgehalt des Kaninchenserums.

Die Normalwerte des Calciums im Serum der verwendeten Versuchstiere schwankten zwischen 10,21 und 15,5 mg % Calcium. Als Mittelwert wurde 13,4 mg % Calcium gefunden. Dieser Wert stimmt mit den Angaben in der Literatur gut überein. Bečka[12]) fand z. B. als Durchschnittswert 12 mg Calcium pro 100 ccm Serum.

Der Gehalt des Kaninchenserums an anorganischem Phosphor schwankte in 13 Versuchen zwischen 0,49 und 2,08 mg % Phosphor pro 100 ccm. Als Mittelwert wurde 1,52 mg Phosphor gefunden. Die von Bečka[13]) nach der gleichen Methode ge-

---

[10]) Kramer, B. und F. F. Tisdall: Journ. of biol. Chem. Bd. 47, S. 475, 1921.

[11]) Fiske, C. H. and Subbarow, Y.: J. of biol. Chem. 1925, Bd. 66, S. 388.

[12]) Bečka, Jan: Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 1933, Bd. 170, S. 382.

[13]) Bečka, Jan: Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 1933, Bd. 170, S. 382.

fundenen Werte schwankten zwischen 2,0 und 4,5 mg anorganischem Phosphor pro 100 ccm Serum.

2. Versuche mit einmaliger Injektion von Leberextrakten.

In den Versuchen mit einmaliger Injektion von Leberextrakten erhielten die Tiere unter den oben beschriebenen Bedingungen jeweils 2 ccm der Handelspräparate Campolon, Hepatrat, Heprakton und Hepatopson pro injectione subkutan injiziert. Nach vier Stunden wurde erneut Blut entnommen und der Gehalt des Serums an Calcium und anorganischem Phosphor bestimmt.

Die Versuche führten zu folgendem Ergebnis (Tabelle 1): In allen Fällen kam es zu einer leichten Abnahme des Serumcalciums, die sich zwischen 4,1 und 24,1 % der Normalwerte bewegte. Im Kontrollversuch wurde eine leichte Zunahme des Serumcalciums um etwa 6 % festgestellt. Die Wirkung war bei allen verwendeten Leberextrakten gleichsinnig; am stärksten wirkte Hepatrat (Abnahme 24,1 %), am schwächsten Hepatopson (Abnahme 4,1 %). Daraus ergibt sich, daß die Handelspräparate Campolon, Hepatrat, Heprakton und Hepatopson den Serumkalk leicht erniedrigen.

Tabelle 1.

Nr.	Gew. g	Präparat	Serumcalcium: mg %		Veränderung in % des Normalwertes
			Normal	n. Injektion	
1	2460	Campolon	15,11	12,56	— 16,9
2	2700	Campolon	13,47	11,47	— 14,9
3	3510	Hepatrat	10,21	7,74	— 24,1
4	3410	Heprakton	14,38	12,92	— 10,1
5	2880	Hepatopson	13,29	12,74	— 4,1
6	2830	Kontrolltier	11,62	12,32	+ 6,1

Tabelle 2.

Nr.	Gew. g	Präparat	Anorganischer Serumphosphor: mg%		Veränderung in % des Normalwertes
			Normal	n. Injektion	
1	2460	Campolon	1,91	1,79	— 6,4
2	2700	Campolon	1,91	1,74	— 9,9
3	3510	Hepatrat	0,49	0,39	— 20,0
4	3410	Heprakton	1,86	1,08	— 42,1
5	2880	Hepatopson	2,08	1,47	— 29,4
6	2830	Kontrolltier	1,3	1,1	— 15,1

Ganz ähnlich verhielten sich die Werte für den anorganischen Phosphor. Auch hier trat in allen Versuchen eine Abnahme ein (Tabelle 2); sie betrug 6,4—42,1 %. Heprakton war am stärksten wirksam (Abnahme etwa 42 %), während Campolon den anorganischen Phosphor am wenigsten erniedrigte (6,4—9,9 %). Bei letzterem Präparat war die Abnahme geringer als im Kontrollversuch, in dem sich der Phosphorspiegel spontan um etwa 15 % verminderte.

3. Versuche mit mehrmaliger Injektion von Leberextrakten.

In den Versuchen mit mehrmaliger Injektion von Leberextrakten erhielten die Tiere bei gleicher Fütterung 10 Tage lang tg. einmal 2 ccm der Handelspräparate Campolon, Hepatrat, Heprakton und Hepatopson pro injectione subkutan injiziert. Vierundzwanzig Stunden nach der letzten (10.) Injektion — während dieser Zeit erhielten die Tiere kein Futter — wurde Blut entnommen und der Gehalt an Calcium und anorganischem Phosphor bestimmt.

Tabelle 3.

Nr.	Gew. g	Präparat	Serumcalcium: mg %		Veränderung in % des Normalwertes
			Normal	n. Injektion	
7	1550	Campolon	15,5	13,1	— 15,5
8	2500	Campolon	11,78	14,01	+ 19,8
9	2010	Hepatrat	13,62	14,56	+ 6,9
10	2370	Hepatrat	14,72	13,1	— 11,0
11	2250	Heprakton	12,14	12,74	+ 4,9
12	2170	Hepatopson	14,0	12,38	— 11,6
13	2420	Hepatopson	14,38	13,79	— 4,1

Tabelle 4.

Nr.	Gew. g	Präparat	Anorganischer Serumphosphor: mg %		Veränderung in % des Normalwertes
			Normal	n. Injektion	
7	1550	Campolon	1,96	1,91	— 2,5
8	2500	Campolon	1,62	1,89	+ 10,5
9	2010	Hepatrat	1,52	1,59	+ 4,9
10	2370	Hepatrat	1,62	1,89	+ 10,5
11	2250	Heprakton	1,37	1,74	+ 26,8
12	2170	Hepatopson	1,16	1,86	+ 60,3
13	2420	Hepatopson	0,98	1,69	+ 72,7

Diese Versuche führten zu folgendem Ergebnis (Tabelle 3): In drei Versuchen kam es zu einer Zunahme des Calciumgehaltes von 4,9—19,8 % der Normalwerte. In den übrigen vier Versuchen trat eine Abnahme des Calciumgehaltes von 4,1—15,5 % der Normalwerte ein. Hieraus ergibt sich, daß auch bei längerer Vorbehandlung mit antianaemisch wirkenden Leberextrakten keine gleichmäßige und keine wesentliche Veränderung des Serums im Calciumgehalt hervorgerufen wird.

Bei den Phosphorwerten (Tabelle 4) kam es mit Ausnahme eines Versuches, in welchem eine geringe Abnahme von 2,5 % des Normalwertes eintrat, in allen anderen 6 Versuchen zu einer Zunahme des Gehaltes an anorganischem Phosphor, die sich zwischen 4,9 und 72,7 % bewegte. Am stärksten wirkte Hepatopson, das den anorganischen Serumphosphor um etwa 60 bzw. 73 % erhöhte.

D. Ergebnisse.

Aus den Versuchsergebnissen geht hervor, daß die Wirkung der Leberextrakte Campolon, Hepatrat, Heprakton und Hepatopson bei einmaliger und länger dauernder Vorbehandlung keine gleichsinnige (d. h. entweder nur Erhöhung oder nur Erniedrigung des Calciums bzw. Phosphorgehaltes) ist.

Das Serumcalcium wird bei einmaliger Leberextraktzufuhr vermindert, bei 10tägiger Vorbehandlung tritt nur in einem Teil der Versuche eine Verminderung ein, während die anderen Versuchstiere eine Zunahme des Serumcalciums zeigen.

Der Gehalt des Serums an anorganischem Phosphor verhält sich ganz ähnlich. Nach einmaliger Leberextraktverabreichung nimmt der Serumphosphor ab; nach längerer Vorbehandlung kommt es auch hier teils zur Zunahme teils zur Verminderung.

Der Serumphosphor verändert sich bei einmaliger Injektion in allen Fällen in derselben Weise wie das Serumcalcium; doch sind gesetzmäßige Beziehungen zwischen beiden nicht zu erkennen.

Bei den langfristigen Versuchen gehen Phosphor- und Calciumveränderungen nicht regelmäßig parallel. Wahrscheinlich hängt dieses Verhalten mit alimentären Schwankungen des Serumphosphors zusammen. Warkany, Kramer und Howland[14]) fanden in Versuchen an Menschen und Tieren, daß der

[14]) Literatur bei Heubner, W.: Handb. d. Norm. u. Path. Physiol. Bd. XVI/2, S. 1434 (Warkany: Z. Kinderheilk. 46, 1, 1928 — Kramer und Howland: Proc. biol. chem. 50, XXI, 1922).

Gehalt des Serums an anorganischem Phosphor stark abhängig ist von der Nahrungszufuhr.

Bei allen Versuchen ist auffallend, daß die einzelnen Leberpräparate den Calcium- und Phosphorgehalt so verschieden stark beeinflussen. Diese Unterschiede können nicht auf einen verschiedenen Gehalt an antianämischer Substanz zurückgeführt werden. Das sicher stark antianämisch wirkende Campolon vermindert beispielsweise bei einmaliger Darreichung den Serumphosphor gegenüber dem Kontrollversuch überhaupt nicht, während Heprakton eine Abnahme von etwa 42 % bewirkt.

Die regelmäßige Abnahme des Serumcalciums nach einmaliger Leberextraktinjektion steht in scheinbarem Gegensatz zu der entzündungswidrigen Wirkung der Leberpräparate. Man hätte eher eine Erhöhung des Calciumspiegels erwarten können. Dabei ist aber zu berücksichtigen, daß die entzündungshemmende Wirkung der Calciumsalze von der Calcium-Ionenkonzentration abhängt[15]). Ueber diese sagen unsere Versuche nichts aus. Nur in den Versuchen, in welchen mit der Calciumverminderung gleichzeitig eine Abnahme des Serumphosphors parallel geht, könnte man an eine gleichzeitige Vermehrung der Calciumionen denken. Wie dem auch sei, sicher ist, daß im Sinne der Fragestellung unserer Untersuchungen die Veränderungen des Calcium- und Phosphorgehaltes des Serums nicht zur Feststellung der antianämischen Wirkung der Leberextrakte geeignet sind.

In noch stärkerem Maße gilt das für die Versuche bei länger dauernder Vorbehandlung mit Leberextrakten. Hier fehlt die gleichgerichtete Wirkung (entweder nur Senkung oder nur Erhöhung des Calcium- bzw. Phosphorgehaltes im Serum) überhaupt. Eine Verwendung der Veränderungen als Testreaktion auf antianaemische Wirksamkeit kommt deshalb nicht in Frage.

E. Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. In Uebereinstimmung mit der Literatur sind die Normalwerte im Kaninchenserum im Durchschnitt 13,4 mg % Calcium und 1,52 mg % anorganischer Phosphor.

2. Die antianaemisch wirkenden Leberpräparate des Handels Campolon, Hepatrat, Heprakton und Hepatopson haben bei einmaliger Injektion regelmäßig eine erniedrigende Wirkung auf den Calcium- wie auch auf den Phosphorgehalt des Serums. Bei

---

[15]) Hamburger, R. J.: Biochem. Z. 1922, Bd. 129, S. 153. — Starkenstein, E.: Arch. exp. Path. u. Pharm. 1914, Bd 77, S. 45.

mehrtägiger Behandlung mit den genannten Präparaten kann sowohl eine Erhöhung als auch eine Senkung des Calciumgehaltes eintreten. Der Phosphorgehalt des Serums wird — mit Ausnahme eines Versuches, wo eine ganz geringe Abnahme zu verzeichnen ist — immer erhöht.

3. Die antianaemische Wirkung der Leberextrakte Campolon, Hepatrat, Heprakton und Hepatopson auf den Calcium- und Phosphorgehalt des Serums ist keine regelmäßige. Zwischen der entzündungshemmenden Wirkung der Leberextrakte und dem Verhalten des Serumcalciums bestehen keine gesetzmäßigen Beziehungen.

4. Eine Verwendung der Veränderung des Calcium- und des Phosphorgehaltes im Serum als Testverfahren auf antianaemische Wirksamkeit kommt nicht in Frage.

Lebenslauf.

Geboren wurde ich am 29. April 1905 zu Kaunitz i. W. Nach siebenjährigem Besuch der Volksschule in meiner Heimat besuchte ich das Progymnasium zu Rietberg und das Gymnasium zu Brilon, das ich im März 1926 mit dem Zeugnis der Reife verließ. Ich widmete mich dem Studium der Medizin an den Universitäten München, Bonn — hier bestand ich im Mai 1929 die ärztliche Vorprüfung — Berlin und Münster, wo ich im Februar 1932 die ärztliche Prüfung bestand. Als Medizinalpraktikant war ich sieben Monate in der Universitätshautklinik und 5 Monate auf der inneren Abteilung des Städt. Clemens-Hospitales in Münster. Seit März 1933 bin ich im Besitze der ärztlichen Approbation. Danach hatte ich mehrmals ärztliche Vertretungen und bin seit dem 1. Juni als Volontärassistent im Pharmakologischen Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster/Westf. tätig.

Münster i. W., den 15. September 1933.

Heinrich Nordbrock.